关节腔注射抗坏血酸/氯化铁可延缓骨性关节炎大鼠软骨退变

廖哲霆[1],邢祯全[2],陈宇璠[1],邓仲豪[1],吴德胜[1],赵 亮[1]
[1]南方医科大学南方医院关节与骨病外科,广东 广州 510515;[2]海南省三亚市人民医院脊柱关节科,海南 三亚 572000

摘要:目的 探索关节腔注射抗坏血酸-氯化铁混合液(AA/$FeCl_3$)对骨性关节炎大鼠关节退变的影响。**方法** 将30只成年雄性骨性关节炎大鼠随机等分为两组,自第3周起分别予每周1次关节腔注射生理盐水(对照组)或AA/$FeCl_3$(实验组)。分别于第6、9、12周随机处死每组5只大鼠,使用X线评估关节内骨改变,标本肉眼观、番红/固绿染色和OARSI评分体系评估关节软骨退变,Ⅱ型胶原免疫组化观察细胞外基质变化。**结果** 9周时仅对照组X线下见关节面不平整,12周时对照组关节线消失,实验组出现轻微关节面不平;对照组9周标本肉眼可见明显软骨溃疡,12周见大面积软骨缺损,实验组9周软骨表面粗糙,12周见小范围软骨溃疡;番红/固绿及OARSI评分示第9、12周实验组软骨退变显著轻于对照组(9周对照组 *vs* 实验组:18.67±0.67 *vs* 12.17±2.75;12周:20.11±1.84 *vs* 13.77±0.40,$P<0.05$),第6、9周实验组软骨层Ⅱ型胶原含量显著高于对照组(6周对照组 *vs* 实验组:0.36±0.039 *vs* 0.49±0.029;9周:0.25±0.041 *vs* 0.38±0.040,$P<0.05$)。**结论** 早期关节腔注射抗坏血酸-氯化铁混合液能有效延缓骨性关节炎大鼠的软骨退变。
关键词:骨性关节炎;抗坏血酸;氯化铁;关节腔注射;芬顿反应;潜伏TGFβ1

Intra-articular injection of ascorbic acid/ferric chloride relieves cartilage degradation in rats with osteoarthritis

LIAO Zhenting[1], XING Zhenquan[2], CHEN Yufan[1], DENG Zhonghao[1], WU Desheng[1], ZHAO Liang[1]
[1]Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Department of Spinal Surgery, Sanya People's Hospital, Sanya 572000, China

Abstract: Objective To assess the effect of ascorbic acid/ferric chloride (AA/FeCl3) in attenuating cartilage damage in rats with osteoarthritis. **Methods** Thirty adult male Wistar rats with surgically induced osteoarthritis were randomized into 2 groups for treatment with intra-articular injection of saline (control group) or AA/FeCl3 mixture (AA group) once a week starting from the third week after the operation. At 6, 9, and 12 weeks after the operation, 5 rats from each group were sacrificed for observing subchondral bone changes on X-ray films and evaluation of cartilage degeneration in the right knee joints using safranin-O/Fast green staining and a modified OARSI scoring system. The degradation of the cartilage matrix was observed by immunohistochemical staining for type II collagen. **Results** X-ray examination in saline control group revealed the presence of osteophytes and narrowing of the joint space at 9 weeks, and the joint line disappeared at 12 weeks after the surgery; only slight irregularity of the articular surface was observed in the AA group at 9 and 12 weeks. OARSI scores were significantly lower in AA group than in the control group at 9 weeks (18.67±0.67 *vs* 12.17±2.75; $P<0.05$) and 12 weeks (20.11±1.84 *vs* 13.77±0.40; $P<0.05$) but not at 6 weeks after the surgery. The content of type 2 collagen in AA group was significantly higher than that in the control group at 6 weeks (0.36±0.039 *vs* 0.49±0.029; $P<0.05$) and 9 weeks after the surgery (0.25±0.041 *vs* 0.38±0.040; $P<0.05$). **Conclusions** Early intra-articular injection of AA/FeCl3 can effectively delay the progression of post-traumatic osteoarthritis in rats.
Keywords: osteoarthritis; ascorbic acid; ferric chloride; intra-articular injection; fenton reaction; latent TGFβ1

骨性关节炎(OA)是最普遍的慢性关节疾病,近期研究表明中国45岁以上人群中有症状骨性关节炎患者占8.1%[1-2],随着人口老龄化这一比例还将增大。OA最常累及髋、膝、指间关节,表现为关节疼痛和活动障碍,以关节活动严重受限和人工关节置换为结局[3-4],严重降低患者生活质量并产生高额的医疗开销。

OA的病理改变以软骨退变为主,成年的关节软骨为无血管组织,且软骨细胞仅占总体积5%,因此软骨损伤一旦发生难以自发修复[5-6]。目前临床上OA的非手术治疗方式以控制症状为主,尚不能有效延缓病理发展。口服对乙酰氨基酚或NSAIDs类药物能缓解轻中

度疼痛，但不能延缓或逆转关节软骨退变的结局，且部分药物具有一定肝毒性或易出现胃肠反应，因此不宜长期服用[7-8]。关节腔注射糖皮质激素能缓解口服药物无法控制的中、重度关节痛，但长期疗效较安慰剂并无明显差异[9]，富血小板血浆（PRP）因制备方式不同而疗效差异大[10-11]。

转化生长因子β家族（TGFβs）被认为是维持关节稳态，防止软骨细胞退变，促进软骨组织再生的重要生长因子[12-14]。然而直接向关节腔注射外源性TGFβ耗费巨大，且浓度过高会增加骨赘形成风险[15]。TGFβs在人体微环境包括关节组织内以一种潜伏形式富集（latent-TGFβs），在人类滑膜液中检测到平均1.84 ng/mL的latent-TGFβ1，软骨基质中也有平均68.5 ng/mL的latent-TGFβ1[16-17]。因此将内源性Latent-TGFβ1激活至治疗浓度，从而延缓软骨退变是有可能的。

抗坏血酸（AA）是一种还原性维生素，细胞学实验证实AA能有效降低软骨细胞受到的氧化应激损伤[18]。此外AA可与氯化铁（$FeCl_3$）通过芬顿化学反应产生低毒性过氧化物从而激活latent-TGFβ1[19]。其他研究发现对碘酸盐诱导的OA大鼠每日喂食AA100 mg/kg能延缓其关节软骨退变[20]。然而长期口服治疗量的AA可能引起胃肠反应，血色素沉着症甚至尿路结石[21-22]。以手术方式增加关节不稳定性而建立的大鼠模型是研究OA药物的重要工具。其中前交叉韧带横断联合内侧半月板摘除（ACLT/pMM）因成功率高，不直接损伤关节软骨，造模周期短而被广泛应用[21-22]。目前尚无研究探索关节腔注射AA/$FeCl_3$混合剂对任何OA模型包括ACLT/pMM大鼠的关节退变的影响。综上所述我们提出假设，关节腔注射AA/$FeCl_3$能激活滑膜液和软骨基质中内源性latent-TGFβ1，使其达到治疗浓度。同时抗坏血酸可保护软骨细胞，减轻氧化应激损伤，最终延缓关节软骨退变。本实验通过观察ACLT/pMM大鼠关节腔注射AA/$FeCl_3$后的关节退变情况验证上述假设。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用30只SPF级雄性Wistar大鼠，10~12周龄，体质量300~350 g（南方医科大学南方医院实验动物中心提供）。

1.2 动物造模和分组

大鼠购回后适应饲养环境1周。术前称重，按体质量予腹腔注射3%戊巴比妥（1 mL/kg），联合左后肢肌注速眠新注射液（0.1 mL/kg）。观察角膜反射、趾反射，消失后进行右后肢备皮，碘伏-酒精消毒，铺无菌手术单（图1A）。手术方式采用改良Hulth法[23]。沿右膝关节髌腱内缘依次切开皮肤、筋膜、肌腱，向外侧脱位髌骨。屈曲膝关节暴露关节腔，直视下剪断前交叉韧带，前抽屉实验阳性后摘除内侧半月板（图1B）。术毕逐层缝合切口，酒精消毒切口及周围皮肤（图1C）。术后大鼠被随机分入生理盐水对照组和AA/$FeCl_3$实验组，每组15只。

1.3 关节腔注射

术后第3周末开始，在戊巴比妥麻醉下按体质量对实验组大鼠关节腔注射AA/$FeCl_3$混合液（0.3 mL/kg）每周1次，对照组注射生理盐水。具体做法由右膝髌骨外

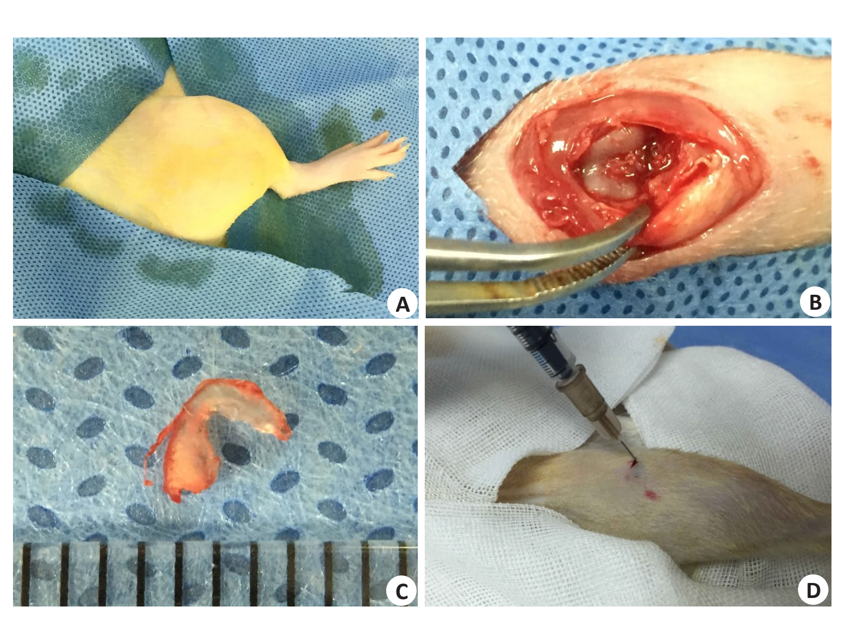


图1 动物手术和关节腔注射

Fig.1 Surgical procedure and intra-articular injection. **A**: Disinfection; **B**: Exposure and disconnection of the anterior cruciate ligament; **C**: Medial meniscus; **D**: Intraarticular injection.

上方向关节腔进针，感受到镂空感后立即推注，注射完毕活动关节。AA/$FeCl_3$混合液成分为AA 2 mmol/L，$FeCl_3$ 200 μmol/L，溶解于注射用生理盐水，配制后0.5 h内注射。AA和$FeCl_3$从美国SIGMA购买。

1.4 X线检查

术后第6、9、12周末，各组分别随机选取5只大鼠，以戊巴比妥麻醉后送至南方医科大学南方医院影像科，进行右膝曲屈位摄片观察关节面及软骨下骨改变。

1.5 标本取材与组织学处理

拍摄X线后在麻醉下以颈椎脱臼法处死大鼠。剥离皮肤肌肉，将右侧膝关节从股骨髁上1 cm至胫骨平台下1 cm完整取下，小心暴露关节腔，剔除剩余肌肉组织。PBS冲洗标本2次，拍摄关节面情况。所有标本被置于4%多聚甲醛中固定48 h，随后用0.5 mol/L EDTA脱钙4周。脱钙结束将标本依次浸入60%、70%、80%乙醇、正丁醇，各4 h。脱水完成后进行常规石蜡包块制作，最终以5 μm厚度在缺损最严重部位连续切片。

1.6 番红O/固绿染色与OARSI评分

切片脱蜡、复水后依次浸染铁苏木素5 min，0.02%固绿1 min，1%冰醋酸30 s，1%番红30 min，随后脱水、透明、封片。基于番红O/固绿染色切片，使用国际骨关节炎研究协会OARSI推荐方法（总分0~24）对软骨退变进行评估[24-25]。简单来说是将内侧胫骨平台软骨损伤深度和范围分别划分为6和4个等级，级数相乘即为得分，每个样本由3位观察者独立评分后取均值。

1.7 Ⅱ型胶原免疫组化及半定量分析

切片脱蜡、复水、抗原修复后，在4 ℃环境中敷大鼠Ⅱ型胶原单克隆抗体（Santa Cruz）14~18 h。次日将切片复温，并按说明书操作DAB免疫组化试剂盒（R&D system），结束后脱水封片。使用Image Pro Plus 6.0软件计算内侧胫骨平台软骨层的累计阳性积分IOD，以及检测区域面积Area，以IOD/Area代表Ⅱ型胶原阳性程度。

1.8 统计方法

所有数据经SPSS 21.0软件分析，首先进行方差齐性和正态性检验，再使用单因素方差分析进行组间比较，方差齐用LSD检验，不齐用DunnettT3检验，$P<0.05$认为差异具有统计学意义。文中数据表述为均值±标准差。

2 结果

2.1 动物术后观察

所有大鼠造模术后2 h苏醒，次日反应、进食良好，切口未见异常，右膝关节稍肿胀。术后第3天肿胀消失，大鼠步态恢复正常，术后第14天切口基本愈合。每次关节腔注射后0.5 h大鼠苏醒，次日右后肢能正常活动，所有大鼠未出现明显关节感染。

2.2 右膝关节X线检查

屈曲位X线检查显示，生理盐水对照组和AA/$FeCl_3$实验组6周时均无明显改变（图2A、D）。9周时对照组关节面不平整，可见骨赘，部分大鼠出现脱位。实验组仍未见明显骨关节炎改变（图2B、E）。两组晚期样本均出现关节线消失，骨赘形成（图2C、F）。

2.3 右膝标本肉眼观

6周时2组内侧关节面均光滑完整（图3A、D）。9周时对照组股骨内髁出现小面积软骨溃疡（箭头所示），内

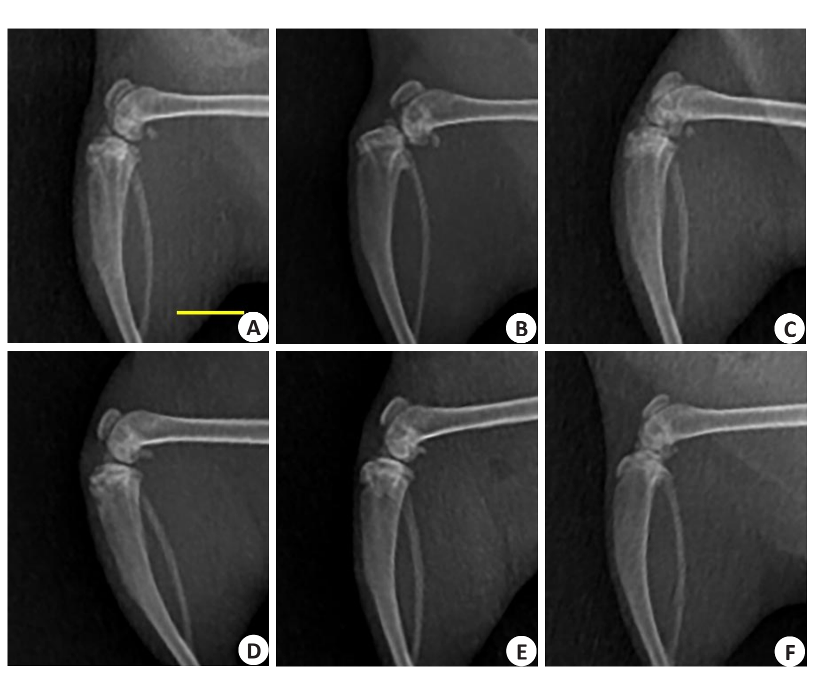


图2 各组大鼠右膝曲屈位X线影像

Fig.2 X-ray films of the right knee (Scale bar=10 mm). **A-C**: Saline group at 6th, 9th, and 12th weeks, respectively; **D-F**: AA/FeCl3 group.

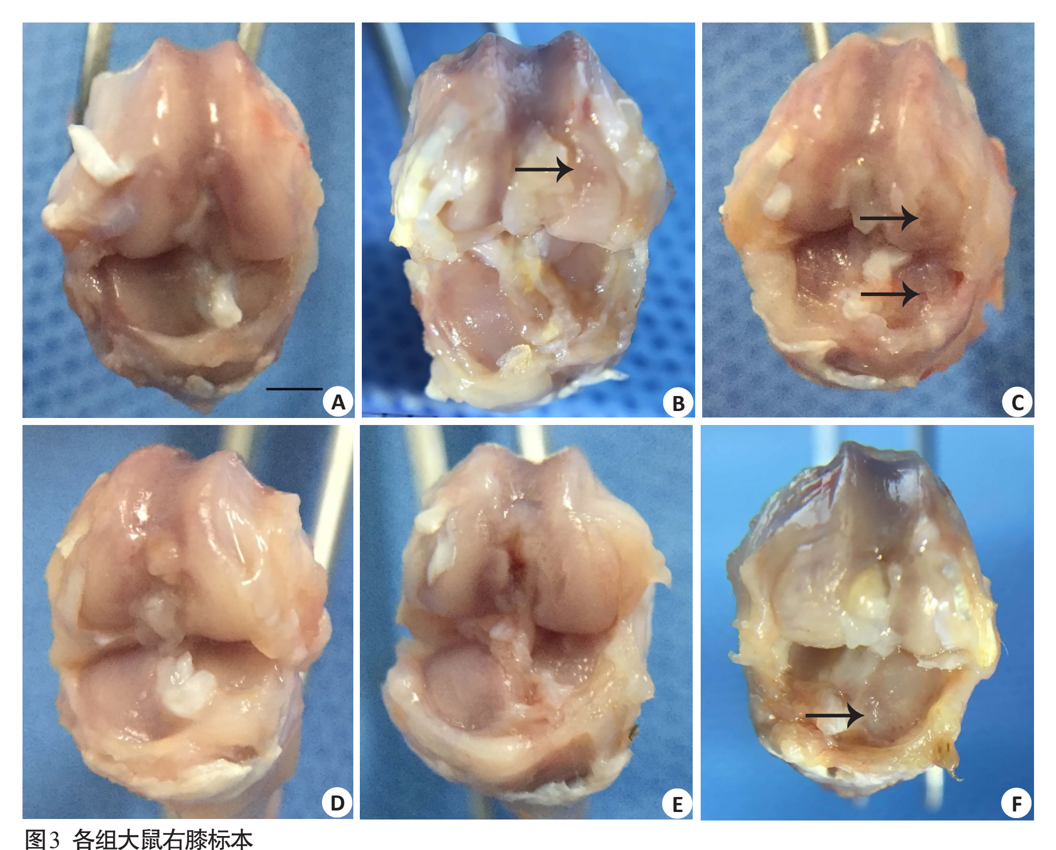


图3 各组大鼠右膝标本

Fig.3 Right knee joint samples (Scale bar=5 mm). **A-C**: Saline group at 6th, 9th, and 12th weeks, respectively; **D-F**: AA/FeCl3 group. Black arrows indicate cartilage defects.

侧胫骨平台表面粗糙；实验组内侧胫骨平台表面粗糙，未见明显缺损(图3B、E)。12周时对照组内侧股骨髁、内侧胫骨平台均出现软骨缺损，深及骨板，外侧关节面粗糙；实验组胫骨平台出现明显溃疡(图3C、F)。

2.4 组化情况及OARSI评分

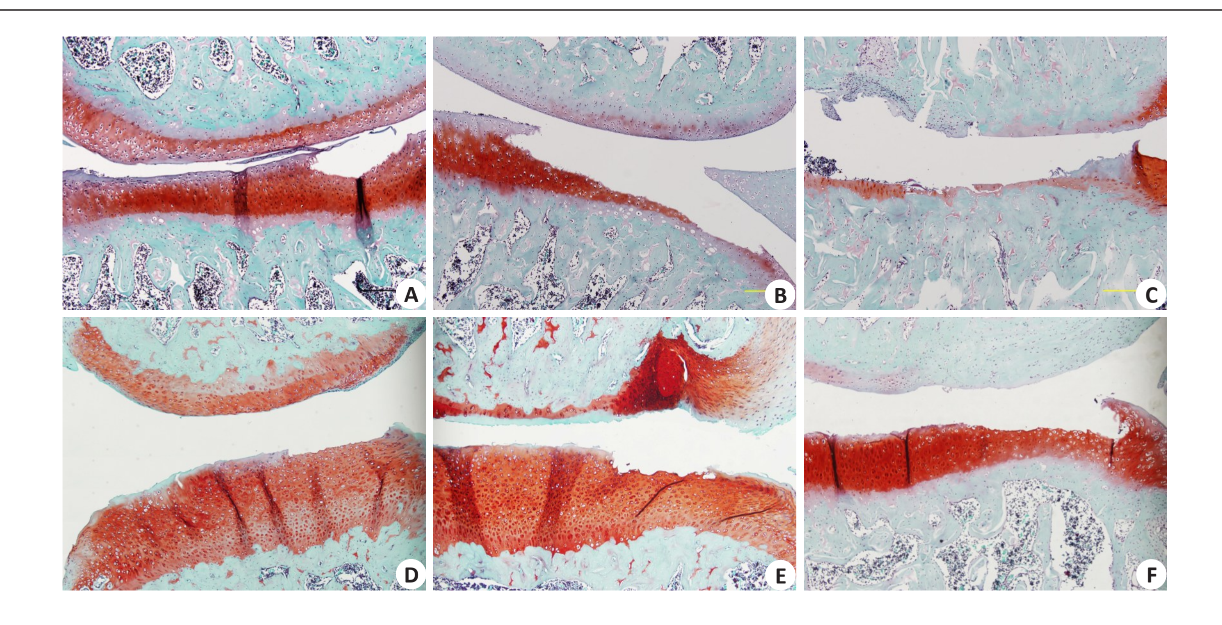
番红O染色图片可见，6周时对照组内侧胫骨平台出现深及中层软骨的小范围缺损(15%~20%)；实验组内侧胫骨平台表层软骨缺损，面积约30%~50%(图4A、D)。9周时对照组内侧胫骨平台软骨缺损达到深层软骨，面积60%~80%；实验组缺损伤及中层软骨，面积约50%(图4B、E)。晚期两组均有大面积缺损，对照组深至钙化软骨层，实验组波及深层软骨(图4C、F)。9周和12周时实验组OARSI评分显著低于对照组(6周18.67±0.67 *vs* 12.17±2.75，$P<0.05$；12周20.11±1.83 *vs* 13.77±0.40，$P<0.05$)。

2.5 软骨层Ⅱ型胶原改变

相比实验组，第6、9周对照组胫骨平台软骨层II型胶原丢失明显，12周时两组无明显区别(图5A~F)。半定量结果示6、9周两组间单位软骨面积内II型胶原含量有显著差异，实验组多于对照组(6周0.366±0.039 *vs* 0.493±0.029，$P<0.05$；9周0.256±0.041 *vs* 0.382±0.040，$P<0.05$)。

3 讨论

OA的一般病理改变为关节软骨退变(软骨细胞凋亡增加，细胞外基质丢失，软骨表面纤维化)，关节边缘骨赘形成，软骨下骨吸收-重构紊乱[26-27]。高龄、关节创伤、肥胖和遗传易感性都被证实是OA的危险因素。OA的分子机制非常复杂，TGFβ1信号通路在OA中有着多重作用。构建了一种关节软骨细胞(AC)特异性的TGFβRⅡ基因敲除鼠，并发现这些小鼠AC高表达OA相关基因如Runx2、Mmp13、Col10以及Adamts5，最终导致自发性OA[28]。在体外利用慢病毒转染使关节软骨细胞高表达TGFβ1蛋白，随后筛选表达稳定且免疫原性低的细胞移植入软骨缺损来治疗OA，目前该治疗技术及产品已通过FDA临床Ⅲ期试验[29]。这些研究表明TGFβ通路能维持AC稳态，延缓软骨退变。而另一方面发现激活ACLT小鼠软骨下骨中骨髓间充质干细胞(BM-MSC)的TGFβ1通路促进骨赘形成，相反抑制该通路能减轻OA的软骨下骨紊乱[30]。可见TGFβ通路在OA中的作用是多重的，TGFβ相关的OA治疗应该针对特异的靶器官或细胞。在本实验中，治疗的起始时间为术后第3周，软骨的退变仍处于非常早期的状态，软骨厚度无显著改变(图4A、E)，因此AA/$FeCl_3$主要激活范围为软骨层，激活软骨层TGFβ通路延缓OA是可能的



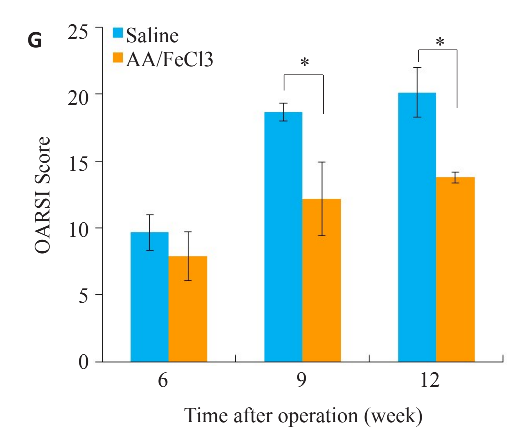


图4 番红O/固绿染色与OARSI评分

Fig.4 Safranin-O/Fast green staining and OARSI scores. **A-C**: Safranin-O/Fast green staining of saline group at 6th, 9th, 12th weeks. **D-F**: AA/FeCl3 group. Scale bar=100 μm. **G**: OARSI scores of each group (*P<0.05).

(图4G)。另一方面,6周、9周实验组X线影像并未见明显骨改变(图2D、E),相反对照组可见骨赘形成(图2B),侧面反映了AA/FeCl$_3$激活范围是安全的。如果以9周、12周为起始点进行治疗,混合液激活范围深至软骨下骨,那么加重软骨下骨紊乱是有可能的,但这需要进一步实验探索。

AA作为还原性维生素对软骨细胞氧化损伤有很好的保护作用[18],有研究表明口服AA有预防OA软骨退变的作用[20, 31]。然而也有学者指出口服AA不能有效预防OA。对几内亚猪喂食AA(2.5~150 mg/d),发现喂食后自发性OA严重程度与计量正相关,并且在新生的骨赘中观察到活性TGFβ1富集[32]。对膝关节创伤患者进行跟踪研究发现,血清高浓度AA是发展为影像学OA的危险因素[33]。这些研究表明口服AA对OA的预防效果并不明确,相反有可能促进关节内骨赘形成,其原因可能与广泛的激活了TGFβ通路有关。在本研究中,关节腔注射的AA总量非常低(0.117 mg/kg),但因为在关节腔内直接接触软骨组织,因此对Latent TGFβ1及其通路的激活更加特异和高效,避免因全身用药引起的不良反应。

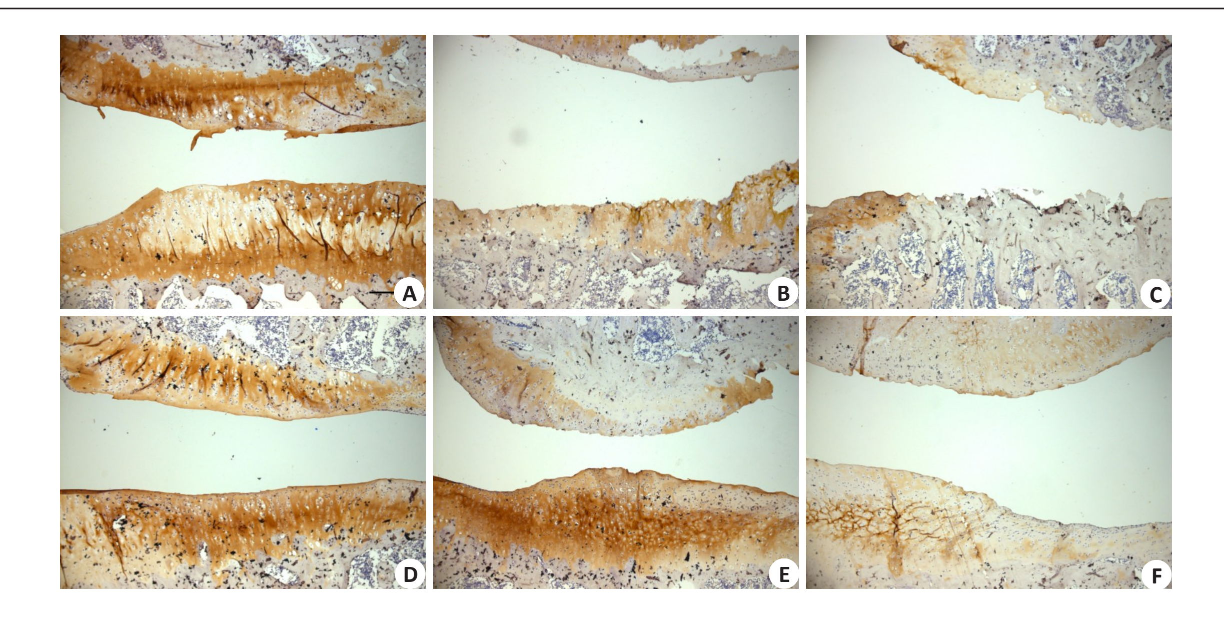
成年关节软骨的主要细胞外基质成分是胶原,尤其是Ⅱ型和Ⅲ型,它们很好的维持了软骨弹性。OA软骨退变时Ⅱ型胶原减少,X型胶原增多,提示软骨细胞终末分化。AA可通过调节转录因子SVCT2,提高II型胶原在关节软骨细胞的转录和转录后表达水平[34]。我们的研究也发现,直接关节腔注射AA能显著降低OA大鼠软骨中Ⅱ型胶原丢失,尤其在早、中期(图5)。

虽然本实验观察到AA/FeCl$_3$混合液能延缓ACLT/pMM模型大鼠的软骨退变,但在转化应用前还有许多问题需要阐明。在未来研究中我们将深入探索该治疗涉及的分子机制,从而获得更加安全有效的成分配比,尝试其他OA造模方法,并在大动物关节内进行验证。同时将细化不同阶段OA对该混合液的反应,并将软骨下骨和滑膜的改变纳入观察范围。

参考文献:

[1] Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results From the China Health and Retirement Longitudinal Study [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68 (3): 648-653.

[2] Li Z. A new look at rheumatology in China—opportunities and



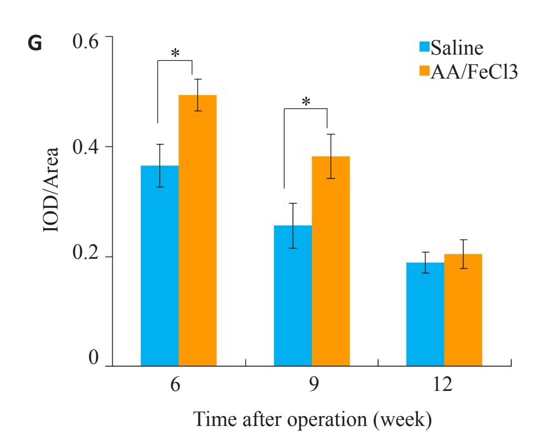


图5 二型胶原染色与半定量分析

Fig.5 Immunohistochemistry of collagen type II. **A-C**: Saline group at 6th, 9th, 12th weeks. **D-F**: AA/FeCl3 group. (Scale bar=100 μm). G: Semi-quantitative results (*P<0.05).

challenges[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11: 313-7.

[3] Oliveria S, Felson D, Reed J, et al. Incidence of Symptomatic Hand, Hip, and Knee Osteoarthritis among Patients in a Health Maintenance Organization [J]. Arthritis Rheumatol, 1995, 38(8): 1134-41.

[4] Bijlsma J, Berenbaum F, Lafeber F, et al. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [J]. Lancet, 2011, 377(9783): 2115.

[5] Boushell MK, Hung CT, Hunziker EB, et al. Current strategies for integrative cartilage repair [J]. Connect Tissue Res, 2017, 58(5): 393-406.

[6] Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11: 21-34.

[7] Schiodt F, Rochling F, Casey D, et al. Acetaminophen Toxicity in an Urban County Hospital[J]. N Engl J Med, 1997, 337: 1112-7.

[8] Garcia RL, Jick H. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Lancet, 1994, 343(8900): 769-772.

[9] Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(2): 137-62.

[10] Weinberg ME, Kaplan DJ, Pham H, et al. Injectable biological treatments for osteoarthritis of the knee [J]. JBJS Rev, 2017, 5(4): e2.

[11] Macmahon PJ, Eustace SJ, Kavanagh EC. Injectable corticosteroid and local anesthetic preparations: a review for radiologists1 [J]. radiology, 2009, 252(3): 647.

[12] Shen J, Li S, Chen D. TGF-βsignaling and the development of osteoarthritis[J]. Bone Res, 2014, 2: 14002.

[13] Lee C, Cook J, Mendelson A. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study [J]. Lancet, 2010, 376: 440-48.

[14] Zhu Y, Tao H, Jin C, et al. Transforming growth factor-β1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal - regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 5573-9.

[15] van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, et al. Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-βinjections [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(1): 25-33.

[16] Albro MB, Cigan AD, Nims RJ, et al. Shearing of synovial fluid activates latent TGF-β [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(11): 1374-82.

[17] Albro MB, Nims RJ, Cigan AD, et al. Dynamic mechanical

compression of devitalized articular cartilage does not activate latent TGF-β[J]. J Biomech, 2013, 46(8): 1433-9.

[18] Chang Z, Huo L, Li P, et al. Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 7086-92.

[19] Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor β (LTGF- β) by reactive oxygen species[J]. Radiat Res, 2006, 166(6): 839-48.

[20] Chiu P, Hu Y, Huang T, et al. Vitamin C protects chondrocytes against monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis by multiple pathways[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 38.

[21] Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview[J]. Nutr J, 2003, 2(1): 7.

[22] Cook J, Reddy M. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet1, 2[J]. Am J Clin Nutr, 2001, 73 (1): 93-8.

[23] 王云峰, 白人骁, 张 扬, 等. 改良Hulth模型复制膝不同时期骨关节炎的实验研究[J]. 天津医科大学学报, 2009(3): 400-4.

[24] Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006(14): 13-29.

[25] Gerwin N, Bendele AM, Glasson S. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010(18): S24-S34.

[26] Karsenty G. An aggrecanase and osteoarthritis[J]. N Engl J Med, 2005, 353(5): 522-3.

[27] Wenham CY, Conaghan PG. The role of synovitis in osteoarthritis [J]. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2010: 2(6): 349-59.

[28] Shen J, Li J, Wang B, et al. Deletion of the transforming growth factor β receptor type II gene in articular chondrocytes leads to a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice [J]. Arthritis Rheumatol, 2013, 65(12): 3107-19.

[29] Cho J, Kim T, Park Y, et al. Invossa™(Tissuegene-C) in patients with osteoarthritis: A phase III trial[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24: S190.

[30] Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF-β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis[J]. Nat Med, 2013, 19(6): 704-12.

[31] Li H, Zeng C, Wei J, et al. Associations between dietary antioxidants intake and radiographic knee osteoarthritis[J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(6): 1585-92.

[32] Kraus VB, Huebner JL, Stabler T, et al. Ascorbic acid increases the severity of spontaneous knee osteoarthritis in a guinea pig model [J]. Arthritis Rheumatol, 2004, 50(6): 1822-31.

[33] Chaganti RK, Tolstykh I, Javaid MK, et al. High plasma levels of vitamin C and E are associated with incident radiographic knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(2): 190-6.

[34] Mcnulty AL, Vail TP, Kraus VB. Chondrocyte transport and concentration of ascorbic acid is mediated by SVCT2[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1712(2): 212-21.